

「CD19 特異的キメラ抗原受容体を発現し、  
Gibbon ape 白血病ウイルスの Env タンパク質を  
エンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモ  
ロニーマウス白血病ウイルス (SFG-1928z)」

生物多様性影響評価書

自治医科大学附属病院

## 生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

### I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### 1 分類学上の位置づけ及び自然環境における分布状況

SFG-1928z (以下、本遺伝子組換え生物という) は、ヒト CD8 $\alpha$  リーダーペプチド、ヒト CD19 特異的マウス一本鎖抗体 (scFv)、ヒト CD28 の一部、及びヒト CD3 $\zeta$  鎖の細胞内シグナル領域を結合させた CD19 特異的キメラ抗原受容体 (以下、1928z という) を発現し、Gibbon ape 白血病ウイルスの Env タンパク質をエンベロープに持つ非増殖性の遺伝子組換えモロニーマウス白血病ウイルスであり、増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。本遺伝子組換え生物の宿主はモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) である。

レトロウイルス科はアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ及びイプシロンレトロウイルス、レンチウイルス (いずれもオルソレトロウイルス亜科) 並びにスプーマウイルス (スプーマレトロウイルス亜科) の7つの属に分類される。マウス白血病ウイルス (Murine leukemia virus: MLV) はガンマレトロウイルス属に属する種である (文献1)。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスとして発見された。MoMLV は、実験室内で MLV を継代することにより、病原性の高いウイルス株として Sarcoma 37 細胞から単離されたエコトピック (同種指向性) レトロウイルスである。MoMLV は発がん遺伝子を持たず、マウスの年齢及び系統にかかわらず感染し、長期間感染したマウスのほぼすべてがリンパ性白血病を発症することが報告されている (文献2)。MoMLV はマウスやラット等のげっ歯類にのみ感染し、ヒトを含む他の動物に対する感染性や病原性の報告はない。

文献1: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

文献2: Moloney JB. Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. J Natl Cancer Inst 24:933-951 (1960).

#### 2 使用等の歴史及び現状

レトロウイルスは、医学生物学領域において遺伝子導入ベクターとしての応用が最も早く進んだウイルスであり、米国で行われた遺伝子治療の最初の臨床例も組換えレトロウイルスを用いたものであった (文献3)。遺伝子治療/遺伝子マーキングの臨床プロトコールでは、組換えレトロウイルスを用いたものが 19.9% を占める (文献4)。レトロウイルスの中でも MoMLV は遺伝子導入用ベクターとして広く使われている。

文献3: Blaese RM, et al. T Lymphocyte-directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results after 4 Years. Science 270:475-480 (1995).

文献4: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (Updated June 2012)

### 3 生理・生態学的特性

#### (1) 基本的特性 (文献5)

MoMLV 粒子は直径約 100 nm の球形の C 型粒子であり、ウイルスゲノムを内包するコアとそれを取り囲むエンベロープ(外被)からなる。コアは主としてカプシドタンパク質(CA)により構築されており、その中に2分子のRNAゲノムを有する。そのほか、逆転写酵素(RT)、インテグラーゼ(IN)、プロテアーゼ(PR)、核酸結合タンパク質(NC)もコア内部に存在する。コアの周囲にはウイルス産生細胞の細胞膜に由来する脂質二重膜のエンベロープが存在する。エンベロープとコアの間にはマトリックスタンパク質(MA)が存在する。エンベロープには膜貫通タンパク質(TM)が突き刺さっており、それに表面タンパク質(SU)が弱く結合している。SUとTMの複合体はウイルス粒子のエンベロープ上で多量体(おそらくは三量体)を形成する。

#### (2) 生息又は生育可能な環境の条件

他のウイルスと同様に、MoMLVは宿主細胞に感染した場合にのみ増殖が可能である(I-3-(4)「繁殖又は増殖の様式」参照)。レトロウイルスは比較的不安定なウイルスであり、体液中、培地中等の限られた環境中でしか感染性を保持できない。なお、ショ糖とゼラチンを添加して凍結乾燥を行うと安定に保存できるとの報告がある(文献6)。

#### (3) 捕食性又は寄生性

MoMLVはマウス及びラットの細胞に感染し、ウイルスゲノムは逆転写によりDNAに変換された後、細胞の染色体に組み込まれる(プロウイルス)。他の生物を捕食することはない。

#### (4) 繁殖又は増殖の様式

レトロウイルスはキャリアーである動物の血液中や体液中に存在し、他の個体がそれに接触することにより感染する。レトロウイルスが細胞に感染し増殖するときは、①吸着、②侵入、③逆転写、④宿主染色体への組み込み、⑤RNA合成、⑥タンパク質合成、⑦アセンブリー・放出、⑧成熟といった各段階を経る。一方、レトロウイルスのゲノム配列が生殖系細胞の染色体中にプロウイルスとして組み込まれている場合には、動物の繁殖によって子孫に受け継がれる。

野生型 MoMLV がヒト細胞に感染することはない。ヒト細胞に感染可能なエンベロープタンパク質(例えば、4070A アンフォトロピック Env タンパク質、gibbon ape leukemia virus (GaLV) Env タンパク質)を持つ MoMLV を人為的に作製した場合にはヒトへの感染が可能である。

#### (5) 病原性

MoMLV の病原性に関して、下記のことが報告されている。

- 1) MoMLV は、マウスに悪性腫瘍を含む多様な疾患を発生させる。  
マウスで起こる疾病・病態としては、白血病、リンパ腫、貧血、免疫不全、腫瘍及び神経変性が知られている。
- 2) レトロウイルスのゲノムはランダムに宿主染色体に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を活性化又は不活化し、がん性の変化をもたらす危険性がある。
- 3) 内在性ウイルスとの組換えにより増殖性レトロウイルス (replication competent retrovirus: RCR) が出現する可能性がある。
- 4) MoMLV はマウスやラットにのみ感染するので、ヒトに対する感染性及び病原性はない。
- 5) 感染により宿主細胞が破壊されることはない。

#### (6) 有害物質の産生性

MoMLV が有害物質を産生することはない。また、MoMLV に感染したことにより細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報はない。

#### (7) その他の情報

##### 1) MoMLV の不活化条件

MoMLV と同じレトロウイルス科に属するヒト免疫不全ウイルス (HIV) の滅菌、消毒法として、①121℃、20 分間の高圧蒸気滅菌、②170℃、2 時間の乾熱滅菌、③20~30 分間の煮沸消毒、④有効塩素濃度 0.1~1.0%の次亜塩素酸ナトリウム、⑤70%エタノール又は70%イソプロピルアルコール、⑥3.5~4%ホルマリン又は⑦2%グルタラルが有効である (文献7)。また、10%及び 1%ポピドンヨード液 (文献8)、0.3%過酸化水素水 (文献9) で不活化が可能との報告がある。

紫外線及び熱による液体中の MoMLV 及び HIV の不活化を比較した研究によると (文献10)、MoMLV を 1/10 まで不活化するのに必要な紫外線照射量 ( $D_{10}$ ) は  $2,800 \text{ erg/mm}^2$  であり、熱処理時間 ( $T_{10}$ ) は 50℃では 50 秒、55℃では 20 秒、70℃では 8 秒である。したがって、55℃、2 分間又は 70℃、50 秒間の熱処理により、MoMLV の感染価を  $1/10^6$  に低下させることができると考えられる。また、50℃における  $T_{10}$  が 80~90 秒であるとの報告もある (文献11)。

マウス由来のウイルス産生細胞により産生されたレトロウイルスベクターが仮にヒト体内に侵入したとしても、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化される (文献12)。抗  $\alpha$ -galactosyl 自然抗体を有する旧世界ザル (文献13) の体内に侵入したときにも同様のメカニズムにより不活化される (文献14) と考えられる。

##### 2) MoMLV からの、増殖能欠損型レトロウイルスベクターの構築

本遺伝子組換え生物は MoMLV ベースの SFG-ベクター由来の増殖能欠損型レトロウイルスベクターである。野生型 MoMLV のゲノムから gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子のタンパク質

コード領域を欠失させ、残存する MoMLV の gag 配列は発現しないように塩基置換を行っている。1928z 遺伝子の転写は、5'-long terminal repeat (LTR) の U3 領域にあるエンハンサー及びプロモーターの制御下にある。ポリ A 付加シグナルは 3'-LTR の R 領域に存在する。加えて、ウイルス粒子へのゲノム RNA のパッケージングに必要な  $\Psi$ +パッケージングシグナル配列、レトロウイルススプライズドナー (SD) 配列及びスプライズアクセプター (SA) 配列を有する。1928z 遺伝子の開始コドンは MoMLV の env 遺伝子の開始コドンに相当する位置に挿入されている。

- 文献5：遺伝子治療開発研究ハンドブック 第3章、第2節、1.1 レトロウイルスの増殖サイクル (p. 322)
- 文献6：Levy JA, et al. Freeze-drying is an effective method for preserving infectious type C retroviruses. *J Virol Methods* 5:165-171 (1982).
- 文献7：日本ウイルス学会. ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針. *ウイルス* 43:199-232 (1993).
- 文献8：加藤真吾, 他. プラーク法を用いた各種消毒剤による HIV-1 不活化の検討. *基礎と臨床* 30:3615-3620 (1996).
- 文献9：Martin LS, et al. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152:400-403 (1985).
- 文献10：Yoshikura H. Thermostability of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in a liquid matrix is far higher than of an ecotropic murine leukemia virus. *Jpn J Cancer Res* 80:1-5 (1989).
- 文献11：Yoshikura H. Ultraviolet sensitivity of helper function of murine leukemia virus. *Arch Biochem Biophys* 154:76-83 (1973).
- 文献12：Takeuchi Y, et al. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68:8001-8007 (1994).
- 文献13：Galili Uri, et al. Significance of  $\alpha$ -Gal (Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc-R) Epitopes and  $\alpha$ 1,3 Galactosyltransferase in Xenotransplantation. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:317-327 (1999).
- 文献14：Rother RP, et al. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti- $\alpha$ -galactosyl natural antibody. *J Exp Med* 182:1345-1355 (1995).

## II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### 1 供与核酸に関する情報

#### (1) 構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換え生物のゲノムを構成する供与核酸は、ヒトCD8 $\alpha$ リーダーペプチドをコードする配列、ヒトCD19特異的マウス一本鎖抗体 (scFv) をコードする配列、ヒトCD28遺伝子の部分配列、ヒトCD3 $\zeta$ 鎖遺伝子の部分配列及び人工配列からなる1928z遺伝子である。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と、その配列をDNA配列に変換したものの制限酵素地図を別紙1に示す。また、供与核酸である1928z遺伝子の塩基配列及びコードするアミノ酸配列を別紙2に示す。

#### 1) ヒト CD8 $\alpha$ リーダーペプチドをコードする配列

ヒト CD8 $\alpha$  遺伝子 cDNA の 57 塩基対 (19 アミノ酸) から成る。

#### 2) ヒト CD19 特異的マウス一本鎖抗体 (scFv) をコードする配列

ヒト CD19 タンパク特異的抗体 (マウスモノクローナル抗体) 産生ハイブリドーマ SJ25C1 株の免疫グロブリン G1H 鎖及びL鎖の可変領域をコードする cDNA をクローニングして (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> リンカーで結合した 732 塩基対 (244 アミノ酸) から成る。

#### 3) ヒト CD28 遺伝子の部分配列

ヒト CD28 遺伝子 cDNA のうち、細胞外領域の一部の 120 塩基対 (第 114 アミノ酸～第 153 アミノ酸)、膜貫通領域の 78 塩基対 (第 154 アミノ酸～第 179 アミノ酸) 及び細胞質シグナル伝達領域の 123 塩基対 (第 180 アミノ酸～第 220 アミノ酸) から成る。

#### 4) ヒト CD3 $\zeta$ 鎖遺伝子の部分配列

CD3 zeta isoform 2 遺伝子 cDNA の細胞内シグナル伝達ドメイン領域である第 52 アミノ酸からC末端までの 163 アミノ酸をコードする 336 塩基対と終止コドンから成る。

#### 5) 人工配列

ヒト CD19 特異的マウス一本鎖抗体 (scFv) 遺伝子に含まれる (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> リンカー領域をコードする配列、及びヒト CD19 特異抗体 VL 鎖領域配列とヒト CD28 細胞外領域の部分配列との間に位置する配列 (GCG GCC GCA) である (別紙 2 参照)。

#### (2) 構成要素の機能

供与核酸の機能は以下のとおりである。

#### 1) ヒト CD8 $\alpha$ リーダーペプチドをコードする配列

リーダーペプチドは、ヒト CD8 $\alpha$  の細胞膜表面への局在化に必要であり、シグナルペプチダーゼにより除去される。1928z 遺伝子産物においても同様の機能を有するが、除去されるか否かは不明である。

#### 2) ヒト CD19 特異的マウス一本鎖抗体 (scFv) をコードする配列

ヒト CD19 抗原分子を特異的に認識して結合する。CD19 は B 細胞系の正常細胞、並

びに非ホジキンリンパ腫、急性リンパ球性白血病（ALL）及び慢性リンパ球性白血病（CLL）を含む大部分の B 細胞リンパ腫細胞の表面に発現している。一方、その他の組織には発現していないことから、B 細胞系リンパ腫の標的分子になると考えられている（文献15）。

3) ヒト CD28 遺伝子の部分配列

T細胞の活性化及び増殖を促進する T細胞共刺激受容体であるヒト CD28 の細胞外ドメインの一部、膜貫通ドメイン及び細胞質シグナル伝達ドメインを含み、PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) を介したシグナル伝達を担う。

4) ヒト CD3 $\zeta$  鎖遺伝子の部分配列

細胞質シグナル伝達ドメインであるヒト CD3 $\zeta$  鎖の 3 個の ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 領域を含み、ZAP70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) を介したシグナル伝達を担う。

5) 人工配列

スペーサーである (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> のアミノ酸配列をコードし、BstEII および BglIII 制限部位を介して免疫グロブリン G1 H 鎖と L 鎖の可変領域を連結しているが、本遺伝子組換え生物の生物学的機能には影響を及ぼさないと考えられる。また、配列 (GCG GCC GCA) はキメラ遺伝子を構築するために付加した制限酵素 NotI の認識部位である。

なお、目的とする機能的なヒト CD19 特異的キメラ抗原受容体は、上記のヒト CD19 特異的マウス scFv、ヒト CD28 の部分配列、ヒト CD3 $\zeta$  鎖の細胞内領域及び人工配列から成る発現産物 1928z のホモダイマーにより構成され、標的抗原である CD19 を発現している細胞に対して、HLA 非依存的かつ特異的に細胞傷害活性を示す。

文献15: FM Uckun, et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. Blood 71:13-29, 1988.

2 ベクターに関する情報

(空欄)

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換え生物のゲノムの構成と制限酵素地図を別紙 1 に示す。本遺伝子組換え生物のゲノムの構成成分は、5' 末端側から順に、5'-LTR、 $\Psi$ 、1928z 遺伝子及び 3'-LTR である (別紙 1 を参照)。

## (2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

本遺伝子組換え生物は、パッケージング細胞の染色体にプロウイルス配列が挿入された SFG-1928z 産生細胞から産生される。本遺伝子組換え生物のプロウイルス DNA (SFG-1928z DNA) を挿入したプラスミドである pSFG-1928z は、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された (別紙 3)。

## (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

### 1) パッケージング細胞株

pSFG-1928z は、ウイルス粒子形成に必須な gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を欠いているため、この DNA を通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本遺伝子組換え生物の産生に使用するパッケージング細胞株は、マウス線維芽細胞由来の PG13 (ATCC No. CRL-10686) (文献16)で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (1 つは gag-pol 遺伝子、もう 1 つは env 遺伝子) で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、この第 3 世代のパッケージング細胞を使用した場合には RCR 出現のリスクが極めて少ないことが知られている。

### 2) ウイルス産生細胞株の作製

パッケージング細胞株 Phoenix-eco に pSFG-1928z をトランスフェクションし、培養上清が回収された。この培養上清には、一過性に産生された、パッケージング細胞 PG13 に効率よく感染する組換えレトロウイルス ecotropic Phoenix-eco/1928z が含まれる。回収した上清をパッケージング細胞株 PG13 に感染させることにより、本遺伝子組換え生物の安定な産生細胞が構築された。この細胞を限界希釈培養してサブクローニングを行った。得られたクローンについてウイルスタイター測定 (宿主細胞に HeLa 細胞を用いた感染測定) を行い、抗 1928z 抗体を用いたフローサイトメトリー解析により最も力価の高いクローン PG13-1928z clone34 を得た。PG13/1928z clone34 をさらに限界希釈培養してサブクローニングを行い、PG13/1928z clone3 を選択した。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとし、マイコプラズマ試験、無菌試験及び RCR 試験を実施した。MCB 用シードセルを培養して MCB を作製し、更に、MCB を培養してワーキングセルバンク (WCB) を作製した。セルバンクの作製のフローチャートを別紙 4 に、MCB 及び WCB の品質試験結果を別紙 5 に示す。なお、MCB は国際共同研究施設である米国メモリアル・スローン・ケタリング癌センター (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center: MSKCC) で、WCB はタカラバイオ株式会社草津事業所 (滋賀県草津市野路東七丁目 2 番 62 号) の細胞・遺伝子治療センターにて製造された。

### 3) 本遺伝子組換え生物の製造

本遺伝子組換え生物の製造は、タカラバイオ株式会社草津事業所の細胞・遺伝子治療センターの管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。



WCB を解凍後、拡大培養及び生産培養を行うことにより本遺伝子組換え生物を含む培養上清を得る。これを無菌ろ過した後、小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。本遺伝子組換え生物の製造方法のフローチャートを別紙 6 に示す。こうして製造された本遺伝子組換え生物の各ロットについて品質試験を行う（別紙 7）。

文献16 : Miller AD, et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. J Virol 65:2220-2224 (1991).

#### 4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は本遺伝子組換え生物のゲノム RNA の一部として存在する。凍結保管中は安定である。感染する動植物の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。

本遺伝子組換え生物が細胞に感染すると、移入した核酸を含むウイルスゲノム RNA は逆転写され、プロウイルスとして細胞染色体に組み込まれる。プロウイルスは細胞染色体の複製に伴って複製されるので、移入された核酸は細胞が生きているかぎり安定に保持される。

1928z 遺伝子は MoMLV 由来 LTR の U3 領域により転写される。プロモーターは持続的に機能するので、遺伝子の発現は構成的である。

本遺伝子組換え生物を製造する際に、ウイルス産生細胞の細胞内で本遺伝子組換え生物のゲノム、gag-pol 遺伝子断片及び env 遺伝子断片が相同組換えを起こし、RCR が出現する可能性がある。RCR の出現機構から、その大部分は gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を持ち、1928z 遺伝子を持たないものである。しかし、1928z 遺伝子を持つ RCR の出現する可能性は否定できない。なお、これらの RCR は遺伝子組換え生物等に該当する。

#### 5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

##### 1) SFG-1928z の検出方法

本遺伝子組換え生物は、宿主である MoMLV にはない 1928z 遺伝子を持つので、これらの遺伝子のいずれかを RT-PCR 法で増幅することにより本遺伝子組換え生物の検出が可能である。

##### 2) SFG-1928z により遺伝子導入された細胞の検出方法

細胞から調製したゲノム DNA を鋳型に、パッケージングシグナルに相当する配列をリアルタイム PCR で定量することにより検出可能である。

##### 3) RCR の検出方法

###### ①293 細胞増幅法

293 細胞に検体を添加し、5 回の継代培養を行う。この培養上清を PG-4 細胞に接種し、S+L-アッセイを行う。この方法は増殖能を持つレトロウイルスを検出する方法であり、本遺伝子組換え生物に由来する RCR を特異的に検出するものではない。検出感度は 1 RCR/

接種物であることを確認している。100 mL あたり 1 RCR が含まれる検体から 300 mL の被検試料をサンプリングして接種した場合、95%の確率で被検試料中に RCR が含まれ、検出される。

#### ②RT-PCR 法

被検試料から RNA を調製し、GaLV env 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った後、アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物を検出する。本試験により、末梢血リンパ球中に  $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  の割合で混入した陽性細胞を検出できることを確認している。

### 6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

宿主である MoMLV と本遺伝子組換え生物の間には以下の相違点がある。

・本遺伝子組換え生物は gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を欠損しているため、本遺伝子組換え生物が感染した通常の細胞はウイルス粒子形成に必要なタンパク質を合成できない。したがって、本遺伝子組換え生物は gag-pol 遺伝子及び env 遺伝子を発現する細胞においてのみ増殖できる。

・本遺伝子組換え生物は 1928z 遺伝子を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物が感染した細胞は 1928z を発現する。

・MoMLV がマウス、ラット等のげっ歯類にだけ感染しうるのに対して、GaLV はラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリの細胞に感染するとの報告がある（文献17）。本遺伝子組換え生物はウイルス粒子表面に GaLV Env タンパク質を持つ。したがって、本遺伝子組換え生物はヒト、サル、イヌ等、幅広い動物種の細胞に本遺伝子組換え生物の核酸を伝達しうる。

本遺伝子組換え生物が自立的増殖能を欠損し、幅広い哺乳動物の細胞に感染する点を除いて、ウイルスとしての性質は宿主と同等である。

本遺伝子組換え生物由来の RCR が感染可能な生物種は宿主である MoMLV のそれと異なっているものの、感染様式、病原性及び挿入変異の可能性などの、生物多様性に影響を及ぼす程度に大きな違いはないと考えられる。

文献17 : Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 93:11407-11413 (1996).

### III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### 1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

## 2 使用等の方法

治療施設の所在地 栃木県下野市薬師寺 3311-1

治療施設の名称 自治医科大学附属病院

- (1) SFG-1928z 溶液は、容器に密閉され、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。
- (2) 凍結状態の SFG-1928z 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。患者リンパ球への SFG-1928z 導入操作、SFG-1928z 導入細胞の培養その他の SFG-1928z 希釈溶液及び SFG-1928z 導入細胞の取扱いも同様に P2 実験室内の安全キャビネット内又は P2 実験室内で閉鎖系にて行う。SFG-1928z 希釈溶液及び SFG-1928z 導入細胞の保管は、P2 実験室内の冷蔵庫、冷凍庫又は培養器にて行う。なお、SFG-1928z 希釈溶液若しくはその凍結品又は SFG-1928z 導入細胞を、開放系区域を通過して他の P2 レベル区域に運搬する場合には、密閉した容器に入れ、容器の落下や破損を防止するために当該容器を箱等に入れ運搬する。
- (3) SFG-1928z 溶液（希釈溶液を含む。）又は SFG-1928z 導入細胞を廃棄する際には、ウイルス不活化（高圧蒸気滅菌処理、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液への浸漬処理又は消毒用アルコール処理による。以下同じ。）を行った後、自治医科大学附属病院で定められた医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。
- (4) 被験者に対する SFG-1928z 導入細胞の投与は、環境中への拡散防止措置を適切に執った個室（以下「個室」という。）内において輸注により行う。なお、投与時に SFG-1928z 導入細胞に直接接触する注射針、注射器、チューブ等の器具は使い捨てとし、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (5) 投与後 3 日まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室外の開放区域に出る場合には、マスク及びガウン着用等のウイルス漏出予防措置を義務付ける。
- (6) 個室における管理期間中の被験者の血液及び体液は、その都度適切にウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、被験者の尿及び糞便等の排泄物は、投与翌日以降に行われる被験者の血液を用いたポリメラーゼ連鎖反応法試験にて自律増殖能を獲得したレトロウイルス（以下「RCR」という。）の存在が否定されるまで、適切にウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。なお、これらのウイルス不活化を個室外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。また、臨床検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、

SFG-1928z 溶液及び SFG-1928z 導入細胞の取扱いに準ずる。

- (7) 個室内における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、適切にウイルス不活化を実施した後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分に洗浄する。なお、これらのウイルス不活化又は洗浄を個室外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (8) 個室内における被験者の管理を解除する前に、RCR が被験者の末梢血単核球（以下「PBMC」という。）及び血漿において陰性であることを確認する。RCR が検出されたときは、個室内における管理を継続する。
- (9) SFG-1928z 導入細胞を投与した 3 例の被験者において RCR が検出されなかった場合、それ以降の被験者については、個室内における管理を行わない。
- (10) 個室内における管理解除後又は上記 (9) に該当する場合に、被験者の PBMC 又は血漿から RCR が検出された場合は、直ちに被験者を個室内における管理下に移し、上記(5)から(8)までと同様の措置を執る。

別紙 8：治療施設の地図及び見取り図

別紙 9：自治医科大学附属病院医療廃棄物管理規程

### 3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

遺伝子導入細胞を患者に投与した後、患者の PBMC 及び血漿を試料として、GaLV env 遺伝子に対する RT-PCR 法により RCR のモニタリングを実施する。RCR のモニタリングは、個室における管理解除前もしくは投与 2 日後、投与 28±1 日後及び 84±2 日後並びに投与 15 年後まで 1 年ごとに実施する。

### 4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

本遺伝子組換え生物を用いた遺伝子導入細胞は、P2 レベルの実験室において、第一種使用規程に従い調製される。本遺伝子組換え生物が細胞調製室の床等に漏出した場合には、ただちにペーパータオル、布等で拭き取る。拭き取った後は、消毒用エタノールを当該箇所が完全に覆われるまで噴霧して 1 分以上放置し、ペーパータオル、布等で拭き取ることにより本遺伝子組換え生物を不活化する。当該ペーパータオル、布等は 121℃、20 分間以上オートクレーブにより滅菌した後、廃棄する。以上により、本遺伝子組換え生物が環境中に漏出して生物多様性影響が生じることはないと考えられる。

個室における管理解除後の患者の PBMC 又は血漿において RCR が検出された場合には、第一種使用規程に従い患者を直ちに個室における管理下に移すとともに、血液及び体液の消毒等、第一種使用規程に定められた措置を執る。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

(1) 本遺伝子組換え生物の産生細胞及び最終製品の RCR 試験

本遺伝子組換え生物産生細胞の MCB、本遺伝子組換え生物最終製品及び end of production cell (EPC) について品質試験を実施した。その結果、いずれも RCR 陰性であった (別紙 5、別紙 7)。

(2) 遺伝子導入リンパ球の RCR 試験

本遺伝子組換え生物を用いて健康人由来 PBMC に遺伝子導入を行い、10 日間培養した遺伝子導入細胞について品質試験を実施した。その結果、RCR 陰性であった (別紙 10)。

(3) 遺伝子導入リンパ球の毒性

MSKCC の Brenjents らのグループによる、CLL 患者 8 名および ALL 患者 1 名に対して本遺伝子組換え生物と同一の組換えレトロウイルスにて 1928z 遺伝子を導入した患者自己リンパ球を輸注する臨床試験において、CLL 患者 3 名に発熱性好中球減少症、並びに ALL 患者 1 名に好中球減少及び低血圧の有害事象が認められた (文献18, 19)。Rosenberg らによる、CLL 患者 4 名及び濾胞性リンパ腫患者 4 名に対して組換えレトロウイルスを用いて CD19 特異的 CAR 遺伝子を導入した患者自己リンパ球を輸注する臨床試験において、8 名中 4 名で B 細胞の消失が認められ、IFN- $\gamma$  及び TNF の炎症性サイトカインの増加による急性腎不全や毛細血管漏出症候群等の有害事象が認められた (文献20)。

(4) 本遺伝子組換え生物がヒトに投与され、感染する可能性

遺伝子治療用の遺伝子導入細胞を調製する際には、本遺伝子組換え生物を固相化したバッグ内で PBMC に遺伝子導入を行い、培養後に細胞を濃縮・洗浄する。このため、細胞調製に使用される本遺伝子組換え生物のほとんどは患者に投与される細胞懸濁液から除去されるが、本遺伝子組換え生物がわずかに残存して患者に投与される可能性がある。しかし、マウス由来の産生細胞により製造された本遺伝子組換え生物は、ヒト血清 (補体) により速やかに不活化され、患者体内で遺伝子導入が起きる可能性は低いと考えられる。

文献18 : Brentjens RJ et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. Blood 118:4817-4828, 2011.

文献19 : Brentjens RJ et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: Case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. Mol Ther 18(4): 666-668, 2010.

文献20 : Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. Blood 119(2):2709-2720, 2012.

## 6 国外における使用等により得られた情報

Brentjens らのグループは、本遺伝子組換え生物と同一の組換えレトロウイルスを用いた臨床試験を行った。評価可能な CLL 患者 4 例中 3 例で治療反応が認められたが、別の 1 例は CAR 発現 T 細胞輸注 2 日後にサイトカインストームを伴う敗血症様の反応により死亡した。その後は、輸中 T リンパ球数を減らし、かつ 2 回に分割投与する事で安全に治療を遂行できている (文献 18、19)。

CD19 を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入 T 細胞による遺伝子治療は、米国において、既に多くの施設で実施されている (文献 21)。Rosenberg らのグループが ERBB2 をターゲットとした第 3 世代の CAR 遺伝子治療の臨床試験を実施しており、そこで初めて遺伝子導入 T リンパ球が原因の死亡例が発生している。Target として用いた ERBB2 が正常肺細胞にも発現していた為、大量に投与した遺伝子導入細胞が正常肺細胞に結合し、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが大量に放出されるサイトカインストームがおき、多臓器不全になったと考察されている。従って、今後 First-in-man の試験時には、細胞投与数を厳密に考える必要があると結論付けられている (文献 22)。なお、国内において、ヒトに対する本遺伝子組換え生物の使用経験はない。

文献21 : Cooper L et al. Good T cells for bad B cells, Blood 119: 2700-2702, 2012.

文献22 : Morgan RA, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. Mol Ther 18(4):843-851, 2010.

## IV 生物多様性影響評価

### 1 他の微生物を減少させる性質

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR は GaLV Env タンパク質を持つので、広範囲の動物に感染しうるが、微生物への感染性は知られていない。したがって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

## 2 病原性

### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR は GaLV Env タンパク質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型 GaLV と同様、ラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

### (2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物はヒト、イヌ、サル等の細胞への挿入変異によってがん化を引き起こす可能性がある。マウス、ラットに対する病原性は宿主と同等であると考えられる。

本遺伝子組換え生物からの発現産物である 1928z が T リンパ球において発現した場合、この T リンパ球は CD19 発現細胞特異的な細胞傷害活性を獲得するため、CD19 を発現する B 細胞系腫瘍細胞のみならず正常の B 細胞をも傷害する。したがって、B 細胞の減少に伴う抗体産生機能の低下等により免疫機能が低下する可能性がある。

### (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物が患者 T リンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出る可能性は極めて低く、出たとしてもごく微量である。また、マウス由来の産生細胞により産生された本遺伝子組換え生物はヒト血清により速やかに不活化される（文献 12）。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、通常の細胞に感染してもウイルス粒子を産生することはない。

一方、本遺伝子組換え生物の製造工程中出现した RCR が患者 T リンパ球に混入して患者に輸注された場合には患者体内で RCR が産生される可能性がある。しかし、本遺伝子組換え生物は RCR 出現の可能性が極めて低い第 3 世代のパッケージング細胞を使用して製造されているうえに、本遺伝子組換え生物の最終製品及び遺伝子導入細胞の RCR 陰性を確認してから使用するので、患者体内に RCR が侵入する可能性は極めて低い。また、RCR 試験で検出されなかった RCR が万一患者体内に侵入したとしても、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、RCR が環境中に放出される可能性は極めて低い。

(4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え生物が有害物質を直接に産生することはなく、本遺伝子組換え生物により遺伝子導入された細胞が有害物質の産生能を獲得するとの情報はない。したがって、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

(3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

本遺伝子組換え生物及び RCR は GaLV Env タンパク質を持つので、患者体外に排出された場合には野生型 GaLV と同様、ラット、ハムスター、ウサギ、ミンク、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒト及びニワトリを含む広範囲の動物に感染しうる。したがって、これらの生物種は本遺伝子組換え生物の核酸を伝達されることにより影響を受ける可能性がある。

(2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物又は RCR によってこれらの遺伝子組換え生物の核酸が野生動物のゲノム中に組み込まれる可能性がある。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物が患者 T リンパ球とともに患者に投与されることによって当該施設外に出たとしてもごく微量である。ごく微量の本遺伝子組換え生物によって野生



動物に核酸が伝達される可能性は非常に低い。

遺伝子組換え生物等に該当する RCR が多量に出現した場合には、血液、体液等を通じて他の個体に RCR が感染し、その核酸が伝達される可能性が否定できないが、RCR 出現の可能性は極めて低い。

#### (4) 生物多様性影響が生ずる可能性の有無

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 5 その他の性質

#### 核酸を垂直伝達する性質

本遺伝子組換え生物が感染可能な野生動物等の生殖系細胞のゲノム中に組み込まれて、核酸を垂直伝達する可能性は完全には否定できない。しかし、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物によりその核酸が野生動物に伝達される可能性は非常に低い。RCR が出現しないかぎり、本遺伝子組換え生物の核酸が伝達される細胞は本遺伝子組換え生物が最初に感染した細胞に限られ、その細胞が生殖系細胞である確率は低いと考えられる。また、RCR が出現する可能性は極めて低い。以上から、本遺伝子組換え生物又は RCR の核酸が生殖系細胞に伝達される可能性は極めて低い。よって、核酸を垂直伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

## V 総合的評価

本遺伝子組換え生物が感染する動物種は GaLV Env タンパク質によって規定されるため、げっ歯類及びヒトを含む広範囲の動物であり、野生型 GaLV と同じである。自然界で植物及び微生物に感染することはないと考えられる。

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。導入された SFG-1928z 遺伝子が発現することにより、本遺伝子組換え生物がヒトに病原性を示す可能性は非常に低い。さらに、本遺伝子組換え生物は増殖能を欠損しているため、MLV の感染等により gag、pol 及び env 遺伝子を発現している細胞に感染した場合を除いて増殖することはない。MLV に感染しているマウスに本遺伝子組換え生物が感染すれば、MLV がヘルパーとなって増殖する可能性がある。しかしその場合でも、MoMLV は血液を介してのみ感染するので、本遺伝子組換え

生物の感染が他個体に広がる可能性はほとんどない。ヘルパーを必要とする本遺伝子組換え生物が野生型 MoMLV と同等に増殖することはないので、やがて環境中から消滅すると考えられる。

環境中でマウスに感染し、MLV ゲノムとの相同組換えによって RCR が出現する可能性や、当該第一種使用によって極めて微量の本遺伝子組換え生物由来 RCR が環境中に放出される可能性は完全には否定できないが、RCR の感染性、増殖性、病原性及び核酸を水平伝達する性質は MLV と同等である。ヒトに MLV が感染しても病原性は報告されておらず、RCR がヒト体内に侵入しても、血清中の補体により急速に失活することを考慮すると、ヒト及び他の哺乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。

したがって、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物による生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。